

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

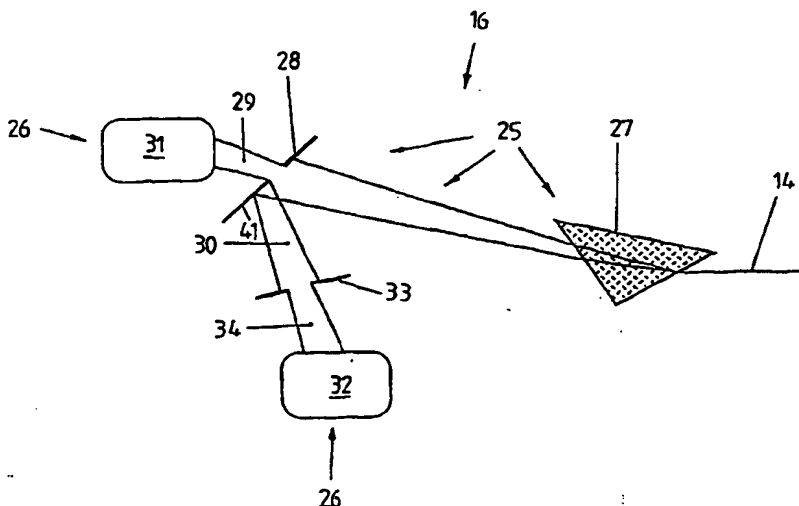
(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>G01J 3/36, 3/12</b>	<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 95/07447</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>16. März 1995 (16.03.95)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE94/01019</b> (22) Internationales Anmeldedatum: <b>6. September 1994 (06.09.94)</b> (30) Prioritätsdaten: <b>P 43 30 347.1      8. September 1993 (08.09.93)      DE</b> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>LEICA LASERTECHNIK GMBH [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 518, D-69120 Heidelberg (DE).</b> (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>ENGELHARDT, Johann [DE/DE]; Schießmauerweg 6, D-76669 Bad Schönborn (DE).</b>	(81) Bestimmungsstaaten: <b>JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	

(54) Title: **DEVICE FOR THE SELECTION AND DETECTION OF AT LEAST TWO SPECTRAL REGIONS IN A BEAM OF LIGHT**

(54) Bezeichnung: **VORRICHTUNG ZUR SELEKTION UND DETEKTION MINDESTENS ZWEIER SPEKTRALBEREICHE EINES LICHTSTRAHLS**

(57) Abstract

Described is a device (16) for the selection and detection of at least two spectral regions in a beam of light (14), the device including a selection unit (25) and a detection unit (26). To ensure reliable simultaneous selection and detection of different spectral regions plus high yield and simplest possible construction, the device is designed such that the selection unit (25) comprises means (27) for splitting the light beam (14) up into its spectral components and means (28) for not only masking off a first spectral region (29) but also reflecting at least part (30) of the spectral region which is not masked off, and the detection unit (26) comprises a first detector (31) located in the path of the light in the masked-off first spectral region (29) and a second detector (32) located in the path of the light of the reflected spectral region (30).



(57) Zusammenfassung

Eine Vorrichtung (16) zur Selektion und Detektion mindestens zweier Spektralbereiche eines Lichtstrahls (14), mit einer Selektionseinrichtung (25) und einer Detektionseinrichtung (26) ist zur zuverlässigen gleichzeitigen Selektion und Detektion unterschiedlicher Spektralbereiche bei hoher Ausbeute und bei einfachster Konstruktion derart ausgestaltet, daß die Selektionseinrichtung (25) Mittel (27) zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls (14) und Mittel (28) einerseits zum Ausblenden eines ersten Spektralbereichs (29) und andererseits zur Reflexion zumindest eines Teils (30) des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs und die Detektionseinrichtung (26) einen im Strahlengang des ausgeblendeten ersten Spektralbereichs (29) angeordneten ersten Detektor (31) und einen im Strahlengang des reflektierten Spektralbereichs (30) angeordneten zweiten Detektor (32) umfaßt.

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## **"Vorrichtung zur Selektion und Detektion mindestens zweier Spektralbereiche eines Lichtstrahls"**

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Selektion und Detektion mindestens zweier Spektralbereiche eines Lichtstrahls, mit einer Selektionseinrichtung und einer Detektionseinrichtung. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung eine Vorrichtung der in Rede stehenden Art, die sich zum Einsatz in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie eignet.

Aus der Literaturstelle "Proceedings of Scanning, Vol. 13, Supplement I, 1991, Seiten I-76 und I-77" ist ein konfokales Fluoreszenzmikroskop bekannt, mit dem sich der Spektralbereich eines Farbstoffes detektieren läßt. Ein von einem Laser erzeugter Lichtstrahl wird mit Hilfe optischer Bausteine zu einem zu mikroskopierenden Objekt geführt und von diesem reflektiert bzw. regt dort Fluoreszenzstoffe an. Der Reflexions- oder Fluoreszenzlichtstrahl wird mittels eines Strahlteilers ausgekoppelt und über ein optisches Filter einem Detektor zugeleitet. Das Filter erfüllt die Aufgabe, den Spektralbereich des Farbstoffes auszublenden. Ist der relevante Farbstoff in dem zu mikroskopierenden Objekt enthalten, so wird dieser aufgrund der hohen Intensität von dem Detektor erkannt. Folglich ist es auf diese Weise bei einer bspw. biomedizinischen Anwendung möglich, eingefärbte Zellen bzw. Zellstrukturen in einem Objekt nachzuweisen.

Auch ist es bereits bekannt, die zuvor beschriebene Mikroskopiertechnik in erweitertem Umfange anzuwenden. So werden bspw. unterschiedliche Zellbestandteile gleichzeitig mit zwei oder mehreren Farbstoffen gefärbt, um die räumliche Korrelation der Zellbestandteile feststellen bzw. untersuchen zu können. Im Rahmen dieser Anwendung ist es jedoch erforderlich, die unterschiedlichen Spektralbereiche der jeweiligen Farbstoffe aus dem

insgesamt reflektierten Lichtstrahl auszublenden. Dazu werden bislang Strahlteiler und optische Filter verwendet, die auf den jeweiligen Spektralbereich exakt abgestimmt sind. Jeder ausgeblendete Lichtstrahl wird dann in für sich bekannter Weise einem eigens dafür vorgesehenen Detektor zugeführt.

Die zuvor genannte, zur Selektion und Detektion mindestens zweier Spektralbereiche eines Lichtstrahls dienende Vorrichtung, von der die hier vorliegende Erfindung ausgeht, hat den ganz erheblichen Nachteil, daß für jeden Farbstoff ein besonderes Filter erforderlich ist. Insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeit der Detektion verschiedener Farbstoffe bzw. Farbstoffkombinationen hat dies zur Folge, daß eine Vielzahl von Filtern - systembedingt - bereitgestellt sein muß. Ein weiterer Nachteil der bekannten Vorrichtung ist darin zu sehen, daß die Intensität des von dem Objekt reflektierten Lichtstrahls durch die Filter verringert wird. Dies hat wiederum zur Folge, daß für eine zuverlässige Selektion und Detektion von Spektralbereichen an die Detektoren erhöhte optische und ggf. elektronische Anforderungen gestellt werden müssen.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung zur Selektion und Detektion mindestens zweier Spektralbereiche eines Lichtstrahls anzugeben, die sich bei einfachster Konstruktion zur zuverlässigen Selektion und Detektion unterschiedlicher Spektralbereiche eignet. Die Selektion und Detektion der unterschiedlichen Spektralbereiche soll gleichzeitig und mit hoher Ausbeute erfolgen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Selektion und Detektion mindestens zweier Spektralbereiche eines Lichtstrahls löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruches 1. Danach ist eine Vorrichtung der in Rede stehenden Art derart ausgebildet, daß die Selektionseinrichtung Mittel zur spektra-

len Zerlegung des Lichtstrahls und Mittel einerseits zum Ausblenden eines ersten Spektralbereichs und andererseits zur Reflexion zumindest eines Teils des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs und die Detektionseinrichtung einen im Strahlengang des ausgeblendeten ersten Spektralbereichs angeordneten ersten Detektor und einen im Strahlengang des reflektierten Spektralbereichs angeordneten zweiten Detektor umfaßt.

In erfindungsgemäßer Weise wird aus dem spektral zerlegten Lichtstrahl ein erster Spektralbereich ausgeblendet. Der nicht ausgeblendete Spektralbereich wird - gleichzeitig - zumindest zum Teil reflektiert, wobei sowohl der ausgeblendete erste Spektralbereich als auch der hier reflektierte Spektralbereich mittels jeweils eines Detektors detektiert wird, und zwar durch Anordnung der Detektoren im jeweiligen Strahlengang. In erfindungsgemäßer Weise ist demnach erkannt worden, daß die Kombination von Ausblenden eines ersten Spektralbereichs und Reflektieren des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs zu einer scharfen Trennung und somit einzelnen Detektion der so voneinander getrennten Spektralbereiche führt. Auf die jeweiligen Spektralbereiche abgestimmte Filter sind somit nicht erforderlich.

Wie bereits zuvor erwähnt, wird aus dem spektral zerlegten Lichtstrahl ein erster Spektralbereich ausgeblendet und der nicht ausgeblendete Spektralbereich wird reflektiert. Die zum Ausblenden dienenden Mittel sind dabei derart ausgelegt, daß der ausgeblendete erste Spektralbereich exakt dem hier zu detektierenden Spektralbereich entspricht. Gleiches gilt für den reflektierten Spektralbereich, der durch besondere Ausgestaltung der Reflexionsfläche definierbar ist. Dieser reflektierte Spektralbereich kann im Rahmen einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung durch im Strahlengang des reflektierten Spektralbereichs angeordnete Mittel im Umfange eines zweiten -

definierten - Spektralbereichs ausgeblendet werden. Der zweite Detektor wäre dann im Strahlengang des ausgeblendeten zweiten Spektralbereichs angeordnet, wobei auch hier wieder eine Selektion - durch den zweiten Detektor selbst - stattfinden könnte.

Sofern eine Selektion und Detektion weiterer Spektralbereiche erforderlich ist, könnten die Mittel zum Ausblenden des zweiten Spektralbereichs - wie im Falle der Mittel zum Ausblenden des ersten Spektralbereichs - Vorkehrungen zur Reflexion zumindest eines Teils des hier nicht ausgeblendeten Spektralbereichs umfassen. Auch hier wäre der zweite Detektor im Strahlengang des ausgeblendeten zweiten Spektralbereichs angeordnet. Im Strahlengang des nunmehr weiter reflektierten Spektralbereichs wäre dann ein dritter Detektor anzuordnen, so daß insgesamt drei Spektralbereiche detektierbar sind. Auch im Strahlengang des weiter reflektierten Spektralbereichs könnten Mittel zum Ausblenden des dritten Spektralbereichs vorgesehen sein, so daß dann der dritte Detektor im Strahlengang des ausgeblendeten dritten Spektralbereichs angeordnet ist. Die zuvor genannte Anordnung, nämlich die Vorkehrung mehrerer Spektralbereiche ausblendenden und reflektierenden Mittel sowie Detektoren, könnte auch in kaskadierter Form kombiniert sein, so daß der jeweils ausgeblendete Spektralbereich detektiert und der jeweils reflektierte Spektralbereich ggf. abermals ausgeblendet und ebenfalls detektiert werden kann.

Hinsichtlich einer besonders kompakten Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist es von besonderem Vorteil, wenn die zum Ausblenden und ggf. zur Reflexion dienenden Mittel und der jeweils dazugehörige Detektor als integrale Baugruppe ausgeführt sind. Zur Kaskadierung wären hier entsprechende Baugruppen zu kombinieren, die lediglich hinsichtlich ihrer Anordnung und Dimensionierung aufeinander abzustimmen sind.

**ERSATZBLATT**

Hinsichtlich einer konkreten Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist es im Hinblick auf eine einfache Konstruktion von Vorteil, wenn die Mittel zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls als Prisma ausgeführt sind. Ebenso könnte es sich hierbei um ein optisches Gitter oder gar um ein Hologramm handeln. Wesentlich ist jedenfalls, daß eine spektrale Zerlegung des einfallenden Lichtstrahls stattfindet, so daß ein divergierender Lichtstrahl zur Verfügung steht.

Zur Beeinflussung der zu selektierenden und schließlich zu detektierenden Spektralbereiche könnte das Prisma bzw. das Gitter oder das Hologramm um eine vorzugsweise orthogonal zum einfallenden Lichtstrahl verlaufende Achse schwenkbar ausgeführt sein. Insoweit ließe sich der Spektralbereich bei feststehenden Mitteln zum Ausblenden einfachst beeinflussen.

Die Mittel zum Ausblenden eines Spektralbereichs könnten als Blende, vorzugsweise als Spaltblende, ausgeführt sein. Handelt es sich dabei um Mittel einerseits zum Ausblenden eines Spektralbereichs und andererseits zur Reflexion zumindest eines Teils des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs, so könnten diese als Spiegelblende ausgeführt sein, die auf mindestens einer ihrer dem einfallenden Licht zugewandten Oberflächen eine vorzugsweise total reflektierende Beschichtung bzw. einen Spiegel aufweist. Sowohl der Spalt der Spaltblende als auch die reflektierende Fläche bzw. die reflektierenden Flächen könnten in ihrer Position und/oder Winkelstellung veränderbar sein, wozu diese Veränderungen vorzugsweise über einen Motorantrieb kontinuierlich, d.h. stufenlos, erfolgen könnten. In Ergänzung zu der Verstellbarkeit des zuvor beispielhaft genannten Prismas läßt sich auch hier der zu selektierende Spektralbereich einstellen bzw. vorgeben, wobei durch kombinierte Einstellbarkeit einerseits der Mittel zur spektralen Zerlegung und andererseits der Mittel zum Ausblenden und Reflektieren eine besonders ex-

akte Vorgabe bzw. Einstellung des interessierenden Spektralbereichs stattfinden kann.

Zur Vermeidung von Beeinflussungen durch Streulicht bzw. zur Unterdrückung des primären Anregungslichtes könnten die Mittel zum Ausblenden eines Spektralbereichs und ggf. zur Reflexion zumindest eines Teils des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs in vorteilhafter Weise weitere Mittel zum Ausblenden von Spektrallinien aufweisen. Dabei könnte es sich vorzugsweise um sog. Lichtfallen handeln. Diese Mittel zum Ausblenden von Spektrallinien könnten als nicht reflektierende Bereiche bzw. lichtabsorbierende Bereiche ausgeführt sein, wobei es sich hier schlicht und einfach um Sacklöcher handeln könnte, worin sich das einfallende Licht nach Mehrfachreflexion "totläuft". Diese zum Ausblenden von Spektrallinien dienenden besonderen Mittel könnten wiederum als integrale Bestandteile der zum Ausblenden der zu detektierenden Spektralbereiche dienenden Mittel ausgeführt sein.

Des weiteren wäre es auch denkbar, die als Lichtfallen dienenden, nicht reflektierenden Bereiche in ihrer Position und/oder Winkelstellung veränderbar zu gestalten, so daß auch insoweit eine exakte Einstellbarkeit gegeben ist. Die Veränderung könnte vorzugsweise über einen Motorantrieb kontinuierlich erfolgen, so daß bestimmte Streulichtzustände kompensierbar sind.

Auch wäre es denkbar, in den unterschiedlichen Strahlengängen der ausgeblendeten und/oder reflektierten Spektralbereiche grundsätzlich Mittel zur Reduktion von Streulicht anzuordnen, so daß durch Streulicht bedingte Störeinflüsse weitgehendst vermieden sind.

Hinsichtlich einer exakten Abstimmung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist es von Vorteil, wenn die Mittel zur spektralen



Zerlegung des Lichtstrahls und die Mittel zum Ausblenden eines Spektralbereichs und ggf. zur Reflexion zumindest eines Teils des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs in ihrer Winkelstellung und/oder Position relativ zueinander veränderbar sind. Insoweit könnte zur Vorgabe des zu detektierenden Spektralbereichs eine exakte Abstimmung stattfinden. Auch könnten die verschiedenen Mittel zum Ausblenden eines Spektralbereichs und ggf. zur Reflexion zumindest eines Teils des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs unter- bzw. zueinander in ihrer Winkelstellung und/oder Position relativ zueinander veränderbar sein. Folglich wäre insoweit eine exakte Einstellung der unterschiedlichen "Ausblendungsstufen" möglich. Schließlich könnten die Detektoren in ihrer Relativlage zu den Mitteln zum Ausblenden eines Spektralbereichs und ggf. zur Reflexion zumindest eines Teils des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs in ihrer Winkelstellung und/oder Position zueinander veränderbar sein. Auch insoweit ließen sich die ausgeblendeten und zu detektierenden Spektralbereiche abermals beeinflussen bzw. vorgeben, wobei sämtliche zuvor genannten Veränderungen von Winkelstellungen und/oder Positionen vorzugsweise über einen Motorantrieb erfolgen können.

Schließlich sei ganz besonders hervorgehoben, daß die zuvor erörterte erfindungsgemäße Vorrichtung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops einsetzbar ist, wobei die Vorrichtung dem eigentlich Fluoreszenzmikroskop zur Aufnahme des dort reflektierten Lichtstrahls bzw. Fluoreszenzlichtstrahls nachgeschaltet ist.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die dem Patentanspruch 1 nachgeordneten Ansprüche, andererseits auf die nachfolgende Erläuterung dreier Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der

Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigt

- Fig. 1 in einem schematischen Blockschaltbild ein konfokales Fluoreszenzmikroskop mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,
- Fig. 2 in einem Diagramm ein über der Wellenlänge und der Intensität eines Lichtstrahls aufgetragenes Koordinatensystem, in dem die Spektren zweier Farbstoffe dargestellt sind,
- Fig. 3 in einem schematischen Blockschaltbild ein erstes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Selektion und Detektion zweier Spektralbereiche eines Lichtstrahls,
- Fig. 4 in einem schematischen Blockschaltbild ein zweites Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Selektion und Detektion dreier Spektralbereiche eines Lichtstrahls und
- Fig. 5 in einem schematischen Blockschaltbild ein drittes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, jedoch mit einer verstellbaren Selektionseinrichtung.

Fig. 1 zeigt in einem schematischen Blockschaltbild den grundsätzlichen Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops 1, bei dem von einem Laser 2 ein Lichtstrahl 3 erzeugt wird. Der

Lichtstrahl 3 wird über einen Umlenkspiegel 4, einen Anregungsfilter 5, eine Linse 6 und eine Blende 7 einem Strahlteiler 8 zugeführt. Von dem Strahlteiler 8 wird der Lichtstrahl 3 um etwa 90° umgelenkt und gelangt über eine weitere Linse 9, einen schwenkbaren Scan-Spiegel 10, ein Okular 11 und ein Objektiv 12 zu dem zu mikroskopierenden Objekt 13. Von dem Objekt 13 wird zumindest ein Teil des dort einfallenden Lichtstrahls 3 reflektiert. Der reflektierte Lichtstrahl 14 durchläuft das Objektiv 12, das Okular 11, den Scan-Spiegel 10 und die Linse 9 zurück zu dem Strahlteiler 8. Dort wird der reflektierte Lichtstrahl 14 geradlinig durchgelassen und gelangt über eine Blende 15 zu der erfindungsgemäßen Vorrichtung 16, in der der Lichtstrahl 14 optisch weiterverarbeitet wird.

Fig. 2 zeigt die Spektren zweier Farbstoffe in einem Koordinatensystem. Auf der Abszisse ist die Wellenlänge des Lichts in Nanometer (nm) und auf der Ordinate ist die relative Intensität des Lichts abgetragen.

Handelt es sich bei dem Laser 2 bspw. um einen Argon-Krypton-Mischgaslaser, so wird von diesem insbesondere eine Argon-Linie 17 bei 488 nm und eine Krypton-Linie 18 beim 568 nm ausgestrahlt. Sind des weiteren Bestandteile des Objekts 13 selektiv mit dem Farbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und dem Farbstoff Lissamin-Rhodamin eingefärbt, so werden der Farbstoff FITC von der Argon-Linie 17 und der Farbstoff Lissamin-Rhodamin von der Krypton-Linie 18 angeregt. Diese Anregungen bewirken im Zusammenhang mit dem Farbstoff FITC eine Absorption 19 im Bereich von etwa 495 nm und eine Emission 20 im Bereich von 528 nm. Bei dem Farbstoff Lissamin-Rhodamin erfolgt eine Absorption 21 im Bereich von etwa 574 nm und eine Emission 22 im Bereich von etwa 602 nm.

Sollen die unterschiedlich eingefärbten Bestandteile des Objekts 13 beim Mikroskopieren erkannt werden, so ist es erforderlich, die Emissionen 20 und 22 der Farbstoffe FITC und Lissamin-Rhodamin zu detektieren. Folglich sind der FITC-Spektralbereich 23 und der Lissamin-Rhodamin-Spektralbereich 24 der Emissionen 20 und 22 zu detektieren. Dies erfolgt bei dem in Fig. 1 dargestellten Fluoreszenzmikroskop 1 mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung 16 zur Selektion und Detektion unterschiedlicher Spektralbereiche.

Fig. 3 zeigt nun ein erstes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung 16 zur Detektion zweier Spektralbereiche eines Lichtstrahls 14, mit einer Selektionseinrichtung 25 und einer Detektionseinrichtung 26.

In erfindungsgemäßer Weise weist die Selektionseinrichtung 25 Mittel 27 zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls 14 und Mittel 28 einerseits zum Ausblenden eines ersten Spektralbereichs 29 und andererseits zur Reflexion zumindest eines Teils 30 des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs und die Detektionseinrichtung 26 einen im Strahlengang des ausgeblendeten ersten Spektralbereichs 29 angeordneten ersten Detektor 31 und einen im Strahlengang des reflektierten Spektralbereichs angeordneten zweiten Detektor 32 auf.

Fig. 3 zeigt des weiteren deutlich, daß die Selektionseinrichtung 25 im Strahlengang des reflektierten Spektralbereichs 30 angeordnete Mittel 33 zum Ausblenden eines zweiten Spektralbereichs 34 umfaßt und daß der zweite Detektor 32 im Strahlengang des ausgeblendeten zweiten Spektralbereichs 34 angeordnet ist.

Bei dem in Fig. 4 dargestellten zweiten Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung 16 weist die Selektionseinrichtung 25 im Strahlengang des reflektierten Spektralbereichs

- 11 -

30 angeordnete Mittel 33 einerseits zum Ausblenden eines zweiten Spektralbereichs 34 und andererseits zur weiteren Reflexion zumindest eines Teils 35 des hier nicht ausgeblendeten Spektralbereichs auf. Der zweite Detektor 32 ist im Strahlengang des ausgeblendeten zweiten Spektralbereichs 34 und ein dritter Detektor 36 ist im Strahlengang des weiter reflektierten Spektralbereichs 35 angeordnet.

Die Selektionseinrichtung 25 des in Fig. 4 dargestellten Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung 16 umfaßt des weiteren im Strahlengang des weiter reflektierten Spektralbereichs 35 angeordnete Mittel 38 zum Ausblenden eines dritten Spektralbereichs 39, wobei der dritte Detektor 36 im Strahlengang des ausgeblendeten dritten Spektralbereichs 39 angeordnet ist. Folglich werden mit dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel insgesamt drei Spektralbereiche 29, 34 und 39 selektiert und detektiert. Entsprechend den Ausführungen in der allgemeinen Beschreibung ist eine Kaskadierung mehrerer Spektralbereiche ausblendenden und reflektierenden Mittel sowie Detektoren möglich, so daß ohne weiteres auch mehr als drei Spektralbereiche gleichzeitig selektierbar und detektierbar sind.

Bei den in den Fig. 3, 4 und 5 dargestellten Ausführungsbeispielen sind die Mittel 27 zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls 14 als Prisma ausgeführt, wobei das Prisma bei dem in Fig. 5 dargestellten dritten Ausführungsbeispiel um eine orthogonal zum einfallenden Lichtstrahl 14 und zur Zeichenebene verlaufende Achse 37 gemäß Pfeil 40 in Fig. 5 schwenkbar ist. Die Mittel 28, 33 und 38 sind jeweils als Spaltblende ausgeführt, wobei zur Reflexion zumindest eines Teils des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs auf einer dem einfallenden Licht zugewandten Oberfläche jeweils eine total reflektierende Beschichtung 41 vorgesehen ist.

Gemäß dem in Fig. 5 dargestellten dritten Ausführungsbeispiel ist der Spalt 42 der Spaltblende sowohl in seiner Position als auch in seiner Dimension gemäß den Pfeilen 43, 44 veränderbar, wodurch sich vorgebbare bzw. einstellbare Spektralbereiche ausblenden lassen. Ebenso sind die die reflektierende Beschichtung 41 tragenden Flächen sowohl in ihrer Position als auch in ihrer Winkelstellung veränderbar, wodurch der reflektierte Spektralbereich ebenfalls beeinflussbar ist.

Hinsichtlich der Vorkehrung lichtabsorbierender Bereiche bzw. von Lichtfallen sowie hinsichtlich der Vermeidung bzw. Reduktion von Streulicht wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf den allgemeinen Teil der Beschreibung verwiesen.

Hinsichtlich der in Fig. 5 dargestellten Ausführungsform wird noch ergänzend darauf hingewiesen, daß die Mittel 27 zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls 14 und die Mittel 28 zum Ausblenden eines ersten Spektralbereichs 29 bzw. zur Reflexion zumindest eines Teils 30 des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs in ihrer Winkelstellung und Position relativ zueinander veränderbar sind. Dies ist durch Pfeil 45 lediglich angedeutet. Gleiches gilt für die Mittel 28 und 33 zum Ausblenden eines Spektralbereichs 29 bzw. 34, was durch Pfeil 46 angedeutet ist. Schließlich lassen sich auch die in Fig. 5 nicht gezeigten Detektoren in ihrer Relativlage zu den Mitteln 28, 33 in ihrer Winkelstellung und Position verändern.

Mit Nachdruck wird nochmals darauf hingewiesen, daß die in den Fig. 3, 4 und 5 dargestellte und zuvor erläuterte erfindungsgemäße Vorrichtung im Strahlengang eines in Fig. 1 schematisch dargestellten Fluoreszenzmikroskops 1 verwendet bzw. angeordnet sein kann.

## Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Selektion und Detektion mindestens zweier Spektralbereiche eines Lichtstrahls (14), mit einer Selektionseinrichtung (25) und einer Detektionseinrichtung (26),

dadurch gekennzeichnet, daß die Selektionseinrichtung (25) Mittel (27) zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls (14) und Mittel (28) einerseits zum Ausblenden eines ersten Spektralbereichs (29) und andererseits zur Reflexion zumindest eines Teils (30) des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs und die Detektionseinrichtung (26) einen im Strahlengang des ausgeblendeten ersten Spektralbereichs (29) angeordneten ersten Detektor (31) und einen im Strahlengang des reflektierten Spektralbereichs (30) angeordneten zweiten Detektor (32) umfaßt.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Selektionseinrichtung (25) im Strahlengang des reflektierten Spektralbereichs (30) angeordnete Mittel (33) zum Ausblenden eines zweiten Spektralbereichs (34) umfaßt und daß der zweite Detektor (32) im Strahlengang des ausgeblendeten zweiten Spektralbereichs (34) angeordnet ist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Selektionseinrichtung (25) im Strahlengang des reflektierten Spektralbereichs (30) angeordnete Mittel (33) einerseits zum Ausblenden eines zweiten Spektralbereichs (34) und andererseits zur weiteren Reflexion zumindest eines Teils (35) des hier nicht ausgeblendeten Spektralbereichs umfaßt, daß der zweite Detektor (32) im Strahlengang des ausgeblendeten zweiten Spektralbereichs (34) angeordnet ist und daß ein dritter Detek-

tor (36) im Strahlengang des weiter reflektierten Spektralbereichs (35) angeordnet ist.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Selektionseinrichtung (25) im Strahlengang des weiter reflektierten Spektralbereichs (35) angeordnete Mittel (38) zum Ausblenden eines dritten Spektralbereichs (39) umfaßt und daß der dritte Detektor (36) im Strahlengang des ausgeblendeten dritten Spektralbereichs (39) angeordnet ist.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Spektralbereiche (29, 34, 39) ausblendende und reflektierende Mittel (28, 33, 38) sowie Detektoren (31, 32, 36) kaskadiert zueinander angeordnet sind, so daß der jeweils ausgeblendete Spektralbereich (29, 34, 39) detektiert und der jeweils reflektierte Spektralbereich (30, 35) ggf. abermals ausgeblendet und ebenfalls detektiert wird.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die zum Ausblenden und ggf. zur Reflexion dienenden Mittel (28, 33, 38) und der jeweils dazugehörige Detektor (31, 32, 36) als integrale Baugruppe ausgeführt sind.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel (27) zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls (14) als Prisma, optisches Gitter oder Hologramm ausgeführt sind.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Prisma, Gitter oder Hologramm um eine vorzugsweise orthogonal zum einfallenden Lichtstrahl (14) verlaufende Achse schwenkbar ist.



- 15 -

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel (28, 33, 38) zum Ausblenden eines Spektralbereichs (29, 34, 39) als Blende, vorzugsweise als Spaltblende, ausgeführt sind.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel (28, 33, 38) einerseits zum Ausblenden eines Spektralbereichs (29, 34, 39) und andererseits zur Reflexion zumindest eines Teils (30, 35) des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs als Spiegelblende ausgeführt sind, die auf mindestens einer ihrer dem einfallenden Licht zugewandten Oberflächen eine vorzugsweise total reflektierende Beschichtung (41) aufweist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Spalt (42) der Spaltblende in seiner Position und/oder Dimension veränderbar ist.

12. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die reflektierende Fläche bzw. die reflektierenden Flächen in ihrer Position und/oder Winkelstellung veränderbar ist bzw. sind.

13. Vorrichtung nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung kontinuierlich, vorzugsweise über einen Motorantrieb, erfolgt.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel (28, 33, 38) zum Ausblenden eines Spektralbereichs (29, 34, 39) und ggf. zur Reflexion zumindest eines Teils (30, 35) des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs (30, 35) weitere Mittel zum Ausblenden von Spektrallinien, insbesondere Lichtfallen, aufweisen.

**ERSATZBLATT**

- 16 -

15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zum Ausblenden von Spektrallinien als nicht reflektierende Bereiche bzw. lichtabsorbierende Bereiche und als integrale Bestandteile der Mittel zum Ausblenden und ggf. zur Reflexion ausgeführt sind.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht reflektierenden Bereiche in ihrer Position und/oder Winkelstellung veränderbar sind.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung kontinuierlich, vorzugsweise über einen Motorantrieb, erfolgt.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß in den unterschiedlichen Strahlengängen der ausgeblendeten und/oder reflektierten Spektralbereiche (29, 34, 39 bzw. 30, 35) Mittel zur Reduktion von Streulicht angeordnet sind.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel (27) zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls (14) und die Mittel (28, 33, 38) zum Ausblenden eines Spektralbereichs (29, 34, 39) und ggf. zur Reflexion zumindest eines Teils (30, 35) des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs in ihrer Winkelstellung und/oder Position relativ zueinander veränderbar sind.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen Mittel (28, 33, 38) zum Ausblenden eines Spektralbereichs (29, 34, 39) und ggf. zur Reflexion zumindest eines Teils (30, 35) des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs in ihrer Winkelstellung und/oder Position relativ zueinander veränderbar sind.

- 17 -

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoren (31, 32, 36) in ihrer Relativlage zu den Mitteln (28, 33, 38) zum Ausblenden eines Spektralbereichs (29, 34, 39) und ggf. zur Reflexion zumindest eines Teils (30, 35) des nicht ausgeblendeten Spektralbereichs in ihrer Winkelstellung und/oder Position zueinander veränderbar sind.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 19 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung kontinuierlich, vorzugsweise über einen Motorantrieb, erfolgt.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, gekennzeichnet durch die Verwendung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (1).

**ERSATZBLATT**

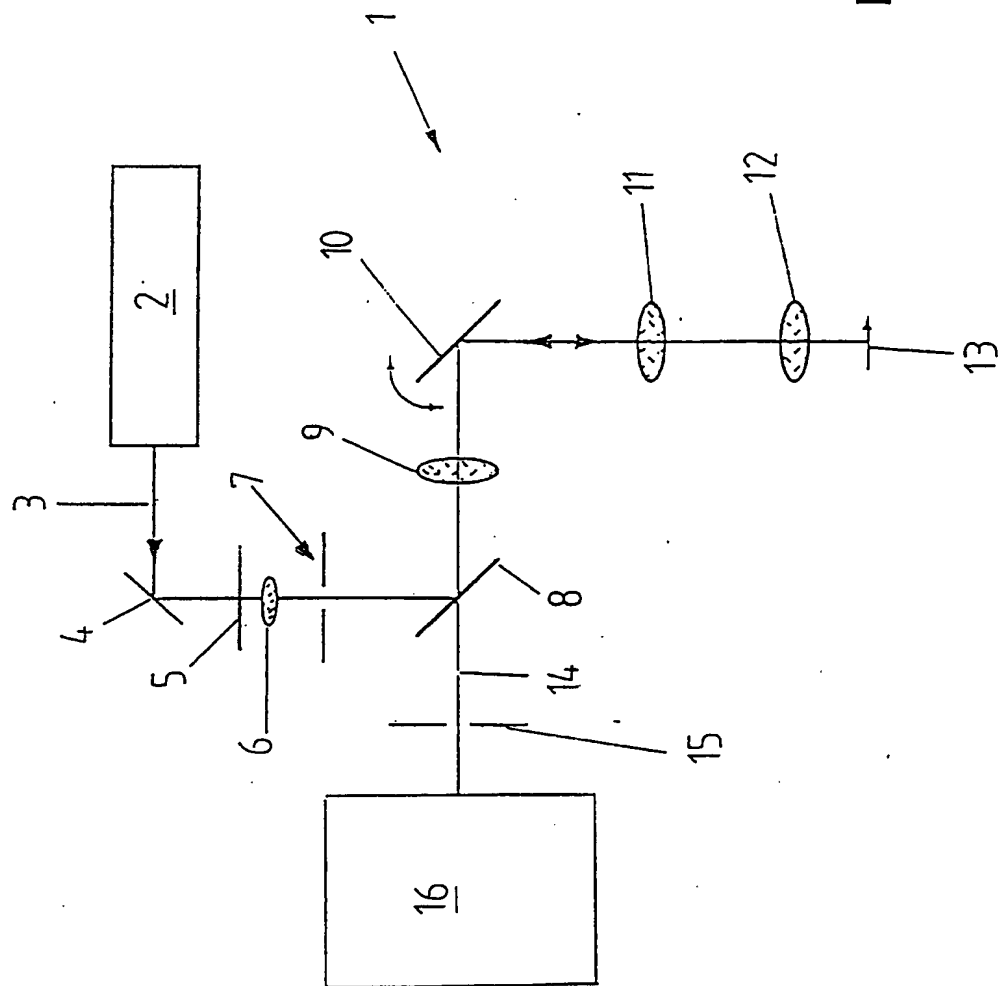


Fig. 1

2/5

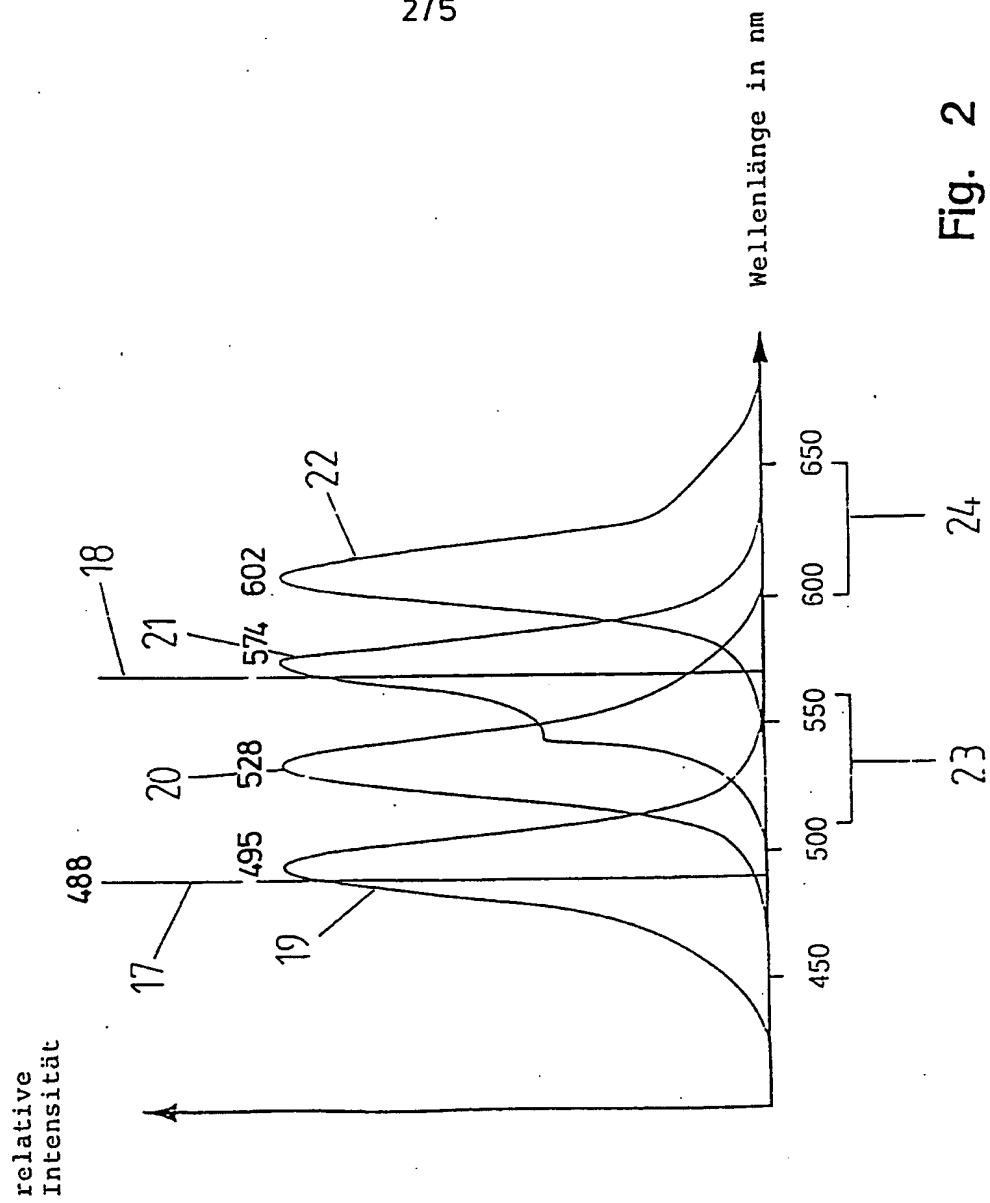


Fig. 2

3/5

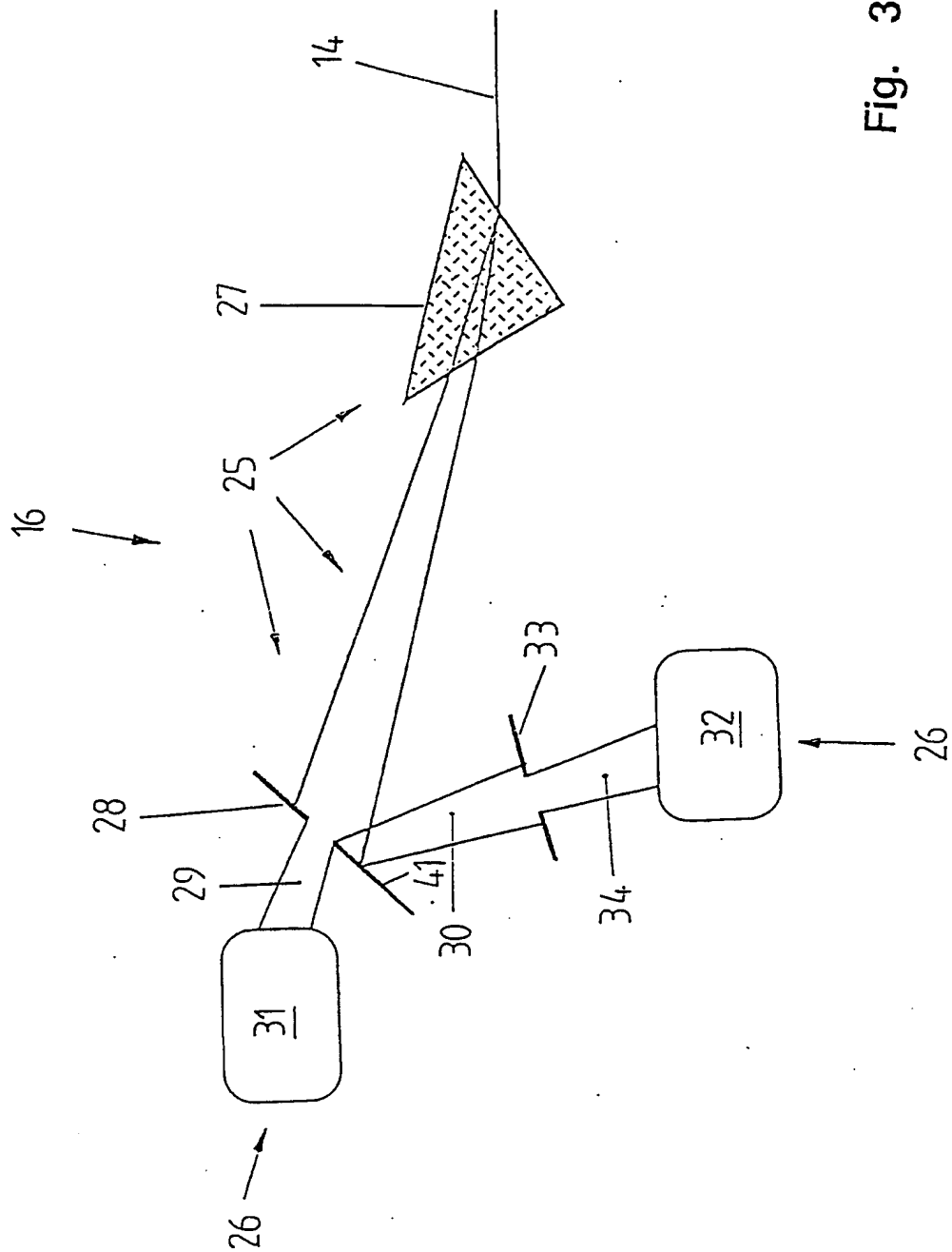


Fig. 3

4/5

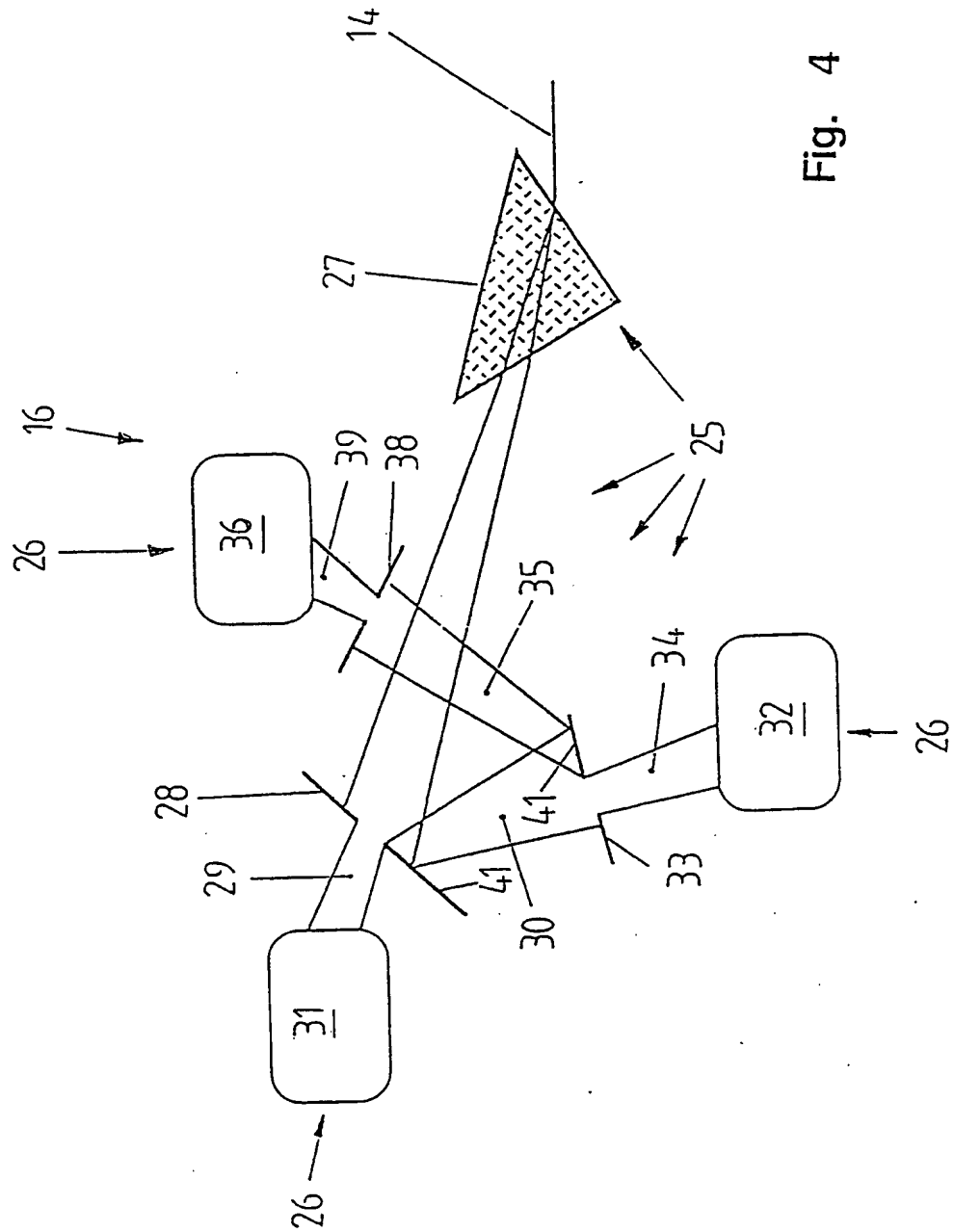


Fig. 4

5/5

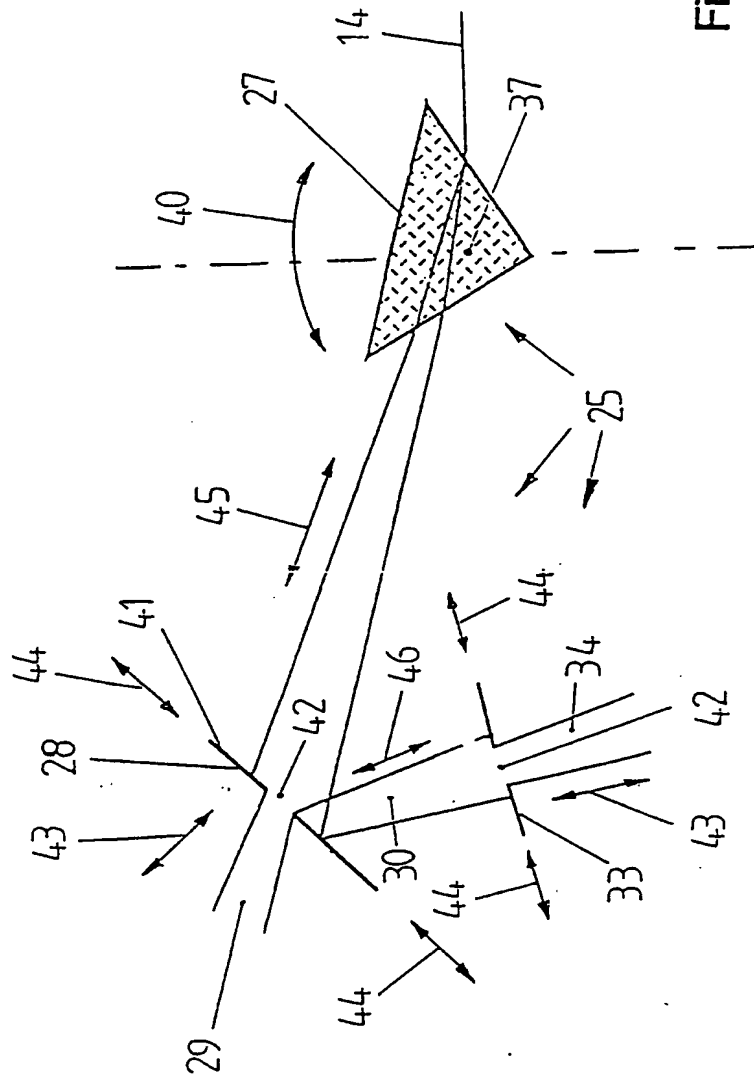


Fig. 5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No

PCT 94/01019

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 6 G01J3/36 G01J3/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01J G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US,A,4 519 707 (F.B.KUFFER) 28 May 1985 see column 2, line 45 - line 65; figure 1 ---	1-13
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 16, no. 319 (P-1385) 13 July 1992 & JP,A,04 093 915 (NIKON CORP) 26 March 1992 see abstract ---	1-13
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 10, no. 154 (P-463) 4 June 1986 & JP,A,61 007 426 (SHIMAZU SEISAKUSHO KK) 14 January 1986 see abstract -----	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 November 1994

Date of mailing of the international search report

18. 11. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheu, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 94/01019

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4519707	28-05-85	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 94/01019

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 G01J3/36 G01J3/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 G01J G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US,A,4 519 707 (F.B.KUFFER) 28. Mai 1985 siehe Spalte 2, Zeile 45 - Zeile 65; Abbildung 1 ---	1-13
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 16, no. 319 (P-1385) 13. Juli 1992 & JP,A,04 093 915 (NIKON CORP) 26. März 1992 siehe Zusammenfassung ---	1-13
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 10, no. 154 (P-463) 4. Juni 1986 & JP,A,61 007 426 (SHIMAZU SEISAKUSHO KK) 14. Januar 1986 siehe Zusammenfassung -----	1-13

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. November 1994

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18. 11. 94

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scheu, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: Sales Aktenzeichen

PCT/DE 94/01019

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-4519707	28-05-85	KEINE	

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**